Aktywność przeciwrodnikowa piwa

Antiradical activity of beer

Tobiasz Śledziński, Dobrawa Kwaśniewska, Ryszard Zieliński

Katedra Technologii i Analizy Instrumentalnej, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

Cel badań. Przedstawienie wyników badań dotyczących zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwrodnikowej kilku próbek piwa obecnego na polskim rynku.

Metoda. Aktywność przeciwrodnikową określono stosując spektrofotometryczną metodę oznaczania zawartości związków fenolowych oraz pomiar kinetyki procesu wygaszania rodnika DPPH przez różne objętości próbek piwa.

Wyniki i wniosek. Stwierdzono, że zawartość fenoli oznaczona w próbkach piwa koreluje z ich aktywnością przeciwrodnikową.

Słowa kluczowe: *piwo, wolne rodniki, antyutleniacze, kinetyka*

Aim. The description of the results of our experimental study on the total phenolic content and the antiradical activity of several beers present on the Polish market.

Method. The antiradical activity was determined by means of the spectrophotometric method of phenolic content determination as well as by using the kinetic measurements of the DPPH radical quenching process in the presence of various amounts of beer samples.

Results & conclusion. The total phenolic content determined for the beer samples is correlated to their antiradical activity.

Key words: *beer, free radicals, antioxidants, kinetics*

www.phie.pl

Nadesłano: 19.06.2013
Zakwalifikowano do druku: 16.07.2013

Adres do korespondencji / Address for correspondence
Prof. dr hab. inż. Ryszard Zieliński
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Wydział Towaroznawstwa,
Katedra Technologii i Analizy Instrumentalnej
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań
tel. 61-8569054, 61-8569055, 61-8569056, fax 61-8543993
e-mail: r.zielinski@ue.poznan.pl

Wprowadzenie

Termin „wolne rodniki" oznacza pojedyncze atomy, grupy atomów lub cząsteczki, które zawierają w swojej strukturze co najmniej jeden niesparowany elektron [1-4]. Wolne rodniki charakteryzują się bardzo wysoką reaktywnością chemiczną. Dlatego w celu stabilizacji wolnych rodników przyłączają lub oddają one elektrony cząstkom znajdującym się w ich najbliższym środowisku. Konsekwencją wysokiej reaktywności chemicznej wolnych rodników jest ich szkodliwe działanie w stosunku do żywych organizmów. Do najbardziej narażonych na atak wolnych rodników należą te składniki żywego organizmu, których cząsteczki zawierają podwójne wiązania, polisacharydy, DNA lub wchodzą w skład błon komórkowych kwasy nienasycone, białka, lipidy (w tym cholesterol) występujące we krwi. Starzenie się organizmu człowieka jest jednym z zewnętrznych przejawów procesów postępujących wraz z upływem czasu. Do głównych czynników stymulujących procesy starzenia należą: upośledzenie mitochondriów (centrów energetycznych komórki), ekspresja genów odpowiedzialnych za procesy starzenia się organizmu, obniżenie aktywność polimerazy DNA (regulującej procesy naprawcze w komórkach), skracanie się telomerów oraz zmiany hormonalne (np. menopauza lub andropauza). W przebiegu większości tych procesów istotną rolę odgrywają wolne rodniki.

W ramach obrony przed wolnymi rodnikami zaleca się spożywanie produktów o wysokiej zawartości przeciwutleniaczy, np. związków polifenolowych czy witamin o właściwościach przeciwutleniających (wit. C i E). Ze względu na mechanizm działania substancji o charakterze przeciwutleniaczy można je podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza z nich obejmuje tzw. przeciwutleniacze pierwotne, których aktywność polega na przerywaniu łańcucha reakcji utleniania poprzez dostarczenie wodoru rodnikom i wytworzenie bardziej stabilnych związków. Mechanizm ten obejmuje następujący schemat reakcji:

$$AH + R^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + RH$$

$$AH + RO^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + ROH$$

$$AH + ROO^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + ROOH$$

gdzie: AH – przeciwutleniacz, RH – składnik utleniany, $A^{\cdot}$, $R^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$ – wolne rodniki.

Przeciwutleniacze pierwotne obejmują m.in. naturalne i syntetyczne tokoferole, galusany propylu (PG) lub oktylu (OG), butylohydroksytoulen (BHT), butylohydroksyanizol (BHA) oraz związki polifenolowe występujące w wielu surowcach roślinnych.

Do drugiej grupy przeciwutleniaczy należą tzw. przeciwutleniacze wtórne (znane także jako przeciwutleniacze drugorzędowe, pomocnicze lub synergenty), które opóźniają procesy utleniania tłuszczów przez procesy inne niż przerywanie łańcucha autooksydacji. Należą do nich głównie procesy: częściowej regeneracji przeciwutleniaczy pierwotnych na drodze ich redukcji, kompleksowanie jonów metali katalizujących reakcje utleniania, tworzenie ochronnej warstwy granicznej pomiędzy powietrzem a składnikami tłuszczowymi, wychwytywania tlenu, pochłanianie promieniowania UV, rozkładu nadtlenków do produktów nierodnikowych oraz dezaktywację tlenu singletowego.

Piwo, podobnie jak wino, zawiera w swoim składzie liczne związki polifenolowe. Związki o takiej strukturze wykazują silne właściwości przeciwutleniające. Biorąc udział w procesie zmiatania wolnych rodników przyczyniają się do zapobiegania skutkom starzenia się organizmu człowieka. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań wstępnych mających na celu określenie zawartości związków polifenolowych w wodnych roztworach handlowych próbek piwa oraz określenie ich aktywności przeciwrodnikowej jako funkcji stężenia próbki.

Ocenia się, że ok. 80% związków fenolowych obecnych w piwie pochodzi ze słodu, a ok. 20% z chmielu. Do głównych związków fenolowych występujących w piwie należą:

- kwasy fenolowe: chlorogenowy, ferulowy, wanilinowy, galusowy, o-kumarowy, p-kumarowy, cynamonowy, syringowy, kawowy;
- pochodne flawan-3-olu (katechinowe lub antocjanogeny): katechina, epikatechina, procjanidyna (utlenione i wysokospolimeryzowane zwane są flobafenami), prodelfinidyny (pochodne galusanu epikatechiny);
- glikozydy flawonowe: ramnozydy i glukozydy kwercetyny, rutyna (kwercetyno-3-rutynozyd), kampferatryna (kampferyloramnozyd).

W procesie warzenia piwa związki fenolowe ulegają przemianom chemicznym prowadzącym do reakcji z białkami i uzyskania właściwości przeciwutleniających. Do najbardziej reaktywnych chemicznie związków fenolowych obecnych w piwie należą flawonoidy ze względu na wystąpienie w ich cząsteczkach charakterystycznego układu trójpierścieniowego – w zależności od zastosowanych surowców jak i sposobów prowadzenia procesów filtracji.

Materiał i metody

Odczynnik Folina-Ciocalteu (POCh); kwas galusowy (Sigma-Aldrich); DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylo-hydrazyl) (Sigma-Aldrich); metanol (POCh). Próbki handlowych piw obejmowały następujące marki dostępne na polskim rynku: Brok Export, Harnaś, Pils Lech, Pilzner Urquell, Premium Lech, Tatra, Tyskie, Warka, Żubr.

W celu dokonania ilościowej charakterystyki badanych handlowych próbek piwa rozcieńczano je wodą redestylowaną. W tak otrzymanych roztworach oznaczano zawartość fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą.

Całkowitą zawartość związków fenowych w piwie oznaczono metodą spektrofotometryczną z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu stosując jako wzorzec kwas galusowy [6]. Wyniki oznaczeń przeliczano na ilość mg kwasu galusowego przypadającą na 1 g wyjściowej próbki piwa. W tym celu do kolby miarowej o pojemności 10 cm^3 odmierzono 0,05-0,20 cm^3 roztworu piwa o stężeniu ustalonym doświadczalnie, 0,5 cm^3 odczynnika Folina-Ciocalteu oraz 6 cm^3 wody redestylowanej. Tak otrzymany roztwór wymieszano i pozostawiono na 3 minuty. Po upływie tego czasu dodano 1,5 cm^3 20% (w/w) wodnego roztworu węglanu sodu i uzupełniono wodą redestylowaną do kreski markowej. Tak przygotowane próbki pozostawiono w ciemności na 2 godziny, a następnie mierzono ich absorbancję przy długości fali 765 nm wobec próby zerowej.

W celu przygotowania roztworów piwa do określania aktywności przeciwrodnikowej z odczynnikiem DPPH zastosowano następujący sposób postępowania. Bezpośrednio po otwarciu wychłodzonej butelki piwa za pomocą pipety automatycznej pobierano próbki badanego piwa o objętości: 0,5; 1,0; 1,5 oraz 2,0 cm^3. Pobrane próbki piwa przenoszono do kolb o pojemności 10 cm3, a następnie zawartość kolb dopełniano wodą redestylowaną do kreski markowej przy ostrożnym mieszaniu zawartości kolb w celu zapobieżenia pienieniu się tak otrzymanych roztworów. W ten sposób otrzymano wodne roztwory piwa o stężeniach: 5, 10, 15 i 20%.

Odczynnik do oznaczania aktywności przeciwutleniającej próbek piwa przygotowano w następujący sposób: odważano 7 mg DPPH, naważkę przenoszono do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3, rozpuszczono w niewielkiej ilości metanolu, a następnie kolbę uzupełniano metanolem do kreski markowej. W ten sposób otrzymano roztwór DPPH o stężeniu 177,5 µM. W celu określenia aktywności przeciwutleniającej próbek badanego piwa w kolbie o pojemności 5 cm^3 umieszczano po 1 cm^3 roztworu piwa, dodawano 1 cm^3 metanolu. Do tak otrzymanej mieszaniny szybko dodano 3 cm^3 roztworu DPPH, jednocześnie

rozpoczynając rejestrację zmian absorbancji. W metodzie kinetycznej z zastosowaniem rodnika DPPH [7] badania prowadzono przy maksimum absorpcji wodno-metanolowego roztworu DPPH (λ=515 nm). W badaniach spektrofotometrycznych stosowano wodne roztwory badanych piw, przy czym stopień rozcieńczenia handlowych próbek dobrano eksperymentalnie. Badania kinetyki procesu wygaszania rodnika DPPH przez wodne roztwory piwa prowadzono przy użyciu spektrofotometru Genesys II (Milton Roy) rejestrując absorbancję próbek piwa przez około 200 sekund co 1 sekundę. Wyniki pomiarów absorbancji A, zapisywano w pamięci komputera klasy PC połączonego ze spektrofotometrem przez interface RS232C. Kinetykę procesu wygaszania rodnika DPPH przez wodne roztwory badanych próbek piwa opisywano za pomocą równania kinetycznego reakcji pseudopierwszorzędowej [7]:

$$A = A_\infty + (A_0 - A_\infty)\, e^{-kt}$$

gdzie: A_0 – absorbancja roztworu w czasie zerowym, A_∞ – absorbancja roztworu w czasie nieskończenie długim, k – stała szybkości procesu wygaszania rodnika DPPH.

Na podstawie danych doświadczalnych wyznaczono wartości liczbowe parametrów równania kinetycznego: A_0, A_∞ oraz k przy zastosowaniu nieliniowej metody najmniejszych kwadratów z wykorzystaniem algorytmu Levenberga i Marquadta zaimplementowanego w narzędziu Solver arkusza kalkulacyjnego Excel 2010. W celu określenia aktywności przeciwrodnikowej badanych próbek piwa przyjęto założenie, że rzeczywistą miarą tej aktywności może być początkowa szybkość, r_0, reakcji rodnika DPPH ze składnikami wodnych roztworów badanych próbek. Szybkość tę można wyznaczyć na podstawie parametrów stosowanego równania kinetycznego jako wartość graniczną szybkości względnej za pomocą równania [5]:

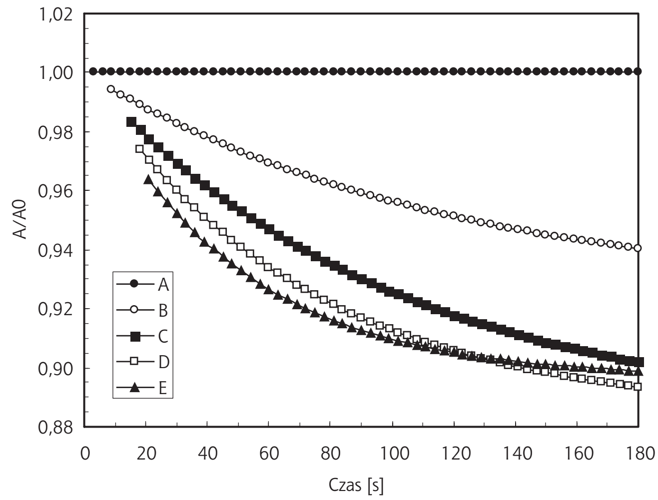
$$r_0 = -\lim_{t\to 0}\left(\frac{1}{A_0}\cdot\frac{dA}{dt}\right) = \lim_{t\to 0} k \cdot \frac{A_0 - A_\infty}{A_0}$$

Wszystkie analizy piw wykonano w kilku powtórzeniach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy zastosowaniu testu t Studenta.

Wyniki i omówienie

Rycina 1 jest typowym przykładem pomiarów aktywności przeciwrodnikowej próbek piwa. Przedstawia ona względną zmianę absorbancji wodnych roztworów próbek piwa jako funkcję czasu reakcji z rodnikiem DPPH. Jak wynika z danych zamieszczonych na tym rysunku wszystkie krzywe można opisać równaniem kinetycznym reakcji pseudopierwszorzędowej.

Wykorzystując tak otrzymane dane doświadczalne dla wszystkich próbek badanych próbek piwa



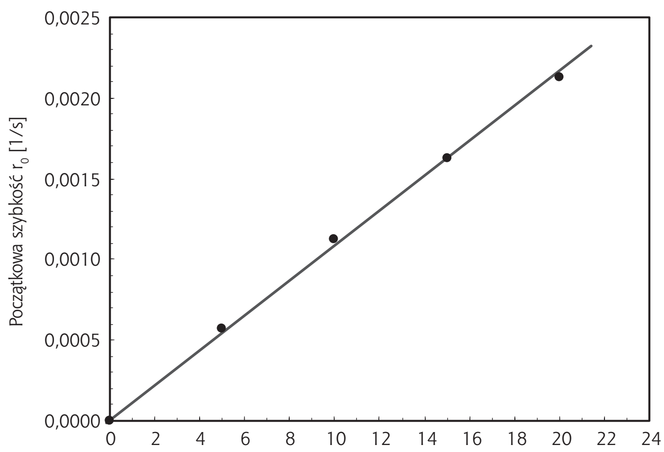
Ryc. 1. Kinetyka procesu wygaszania rodnika DPPH przez wodne roztwory piwa w temperaturze pokojowej. Stężenie piwa: A – 0%, B – 5%, C – 10 %, D – 15%, E – 20%

Fig. 1. Kinetics of DPPH radical quenching by aqueous solutions of beer at room temperature. Concentrations of beer: A – 0%, B – 5%, C – 10 %, D – 15%, E – 20%

wyznaczono wartości liczbowe parametrów równania kinetycznego: A_0, A_∞ oraz k. Wartości te stanowiły podstawę do wyznaczenia względnej wartości początkowej szybkości, r_0, procesu wygaszania rodnika DPPH przez próbki badanych piw o różnych stężeniach.

Na rycinie 2 przedstawiono typowy wykres zależności szybkości r_0 od stężenia piwa w badanej próbce poddanej reakcji z rodnikiem DPPH.

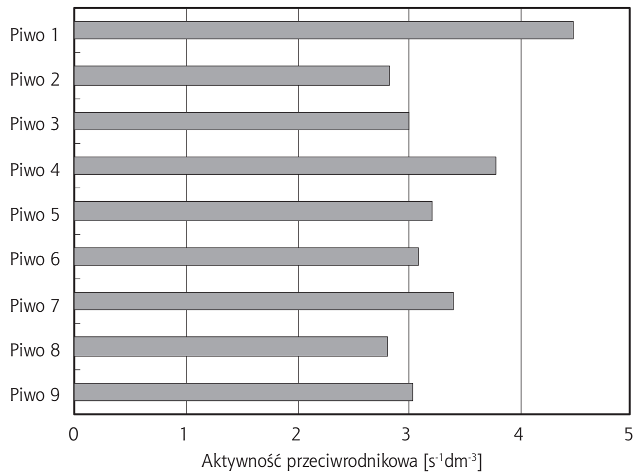
Na podstawie zależności przedstawionej na rycinie 2 wyznaczono wartość nachylenia prostoliniowej zależności otrzymując dla każdego piwa wartość współczynnika stanowiącego ilościową miarę począt-



Ryc. 2. Wpływ stężenia piwa na wartość początkowej szybkości względnej procesu wygaszania rodnika DPPH przez wodne roztwory piwa w temperaturze pokojowej

Fig. 2. Effect of beer concentration on the value of the initial relative rate for the process of DPPH radical quenching by aqueous solutions of beer at room temperature

kowej szybkości wygaszania rodnika DPPH przez substancje aktywne zawarte w nierozcieńczonych próbkach różnych handlowych gatunków piwa o objętości 1 dm^3. Otrzymane w ten sposób dane zestawiono na rycinie 3.



Ryc. 3. Aktywność przeciwrodnikowa handlowych próbek piwa w temperaturze pokojowej

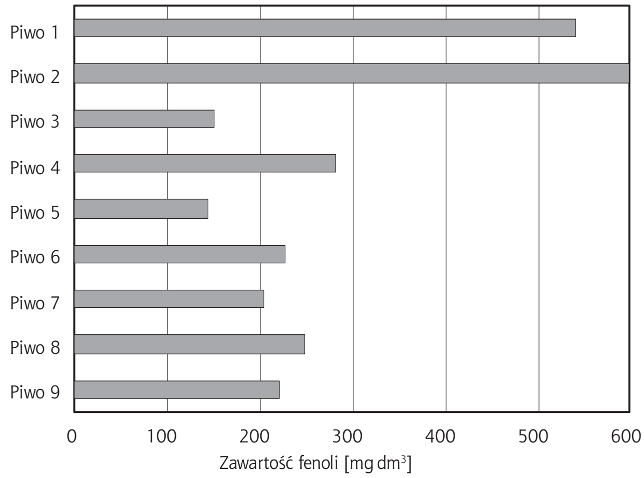
Fig. 3. Antiradical activity of commercially available samples of beer at room temperature

Jak wynika z danych zamieszczonych na rycinie 3 aktywność przeciwrodnikowa handlowych próbek piwa wyznaczona kinetyczna metodą z zastosowaniem rodnika DPPH mieści się w stosunkowo szerokim zakresie: 2,8-4,5 s^{-1} dm^{-3}. Otrzymany wynik wskazuje, że chociaż badane piwa różnią się między sobą walorami smakowymi to ich aktywność przeciwrodnikowa jest stosunkowo wysoka i tylko w pewnym stopniu zależy także od handlowej marki piwa.

Na podstawie wyników badań wstępnych stwierdzono, że absorbancja próbek wzorcowych roztworów kwasu galusowego zmienia się liniowo ze stężeniem tego kwasu zgodnie z równaniem: A=0,124 C [mg/dm^3]. Wykorzystując tak przygotowany układ wzorcowy określono całkowitą zawartość związków fenolowych w handlowych próbkach piwa, a wyniki tych oznaczeń zestawiono na rycinie 4.

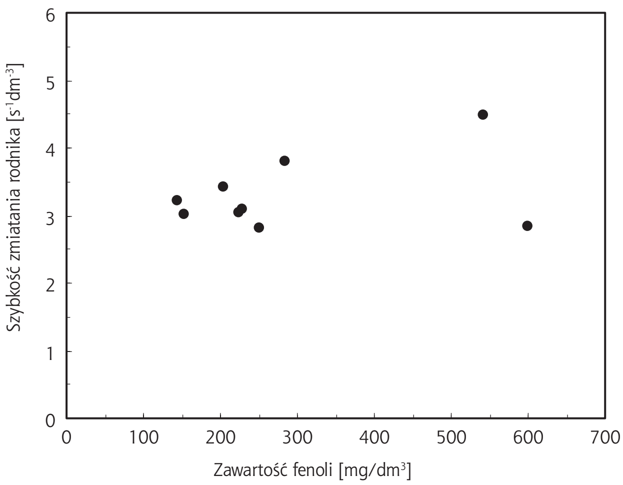
Sumaryczna ilość związków fenolowych w piwie w większości przypadków mieści się w przedziale od 150 do 300 mg/dm^3, co jest zgodne z zalecanym ich poziomem rekomendowanym przez European Brewery Convention oznaczanym przy zastosowaniu metody z odczynnikiem żelazowym [8]. Jedynie w dwóch przypadkach zaobserwowano wyższą zawartość związków fenolowych w badanych handlowych próbkach piwa.

Na rycinie 5 przedstawiono zależność pomiędzy początkową szybkością procesu wygaszania rodnika DPPH przez substancje przeciwrodnikowe obecne w badanych handlowych próbkach piwa wyznaczoną



Ryc. 4. Całkowita zawartość związków fenolowych w handlowych próbkach piwa

Fig. 4. Total phenolic content in commercial samples of beer



Ryc. 5. Zależność pomiędzy początkową szybkością zmiatania wolnych rodników i zawartością związków fenolowych obecnych w handlowych próbkach piwa

Fig. 5. Relationship between the initial rate of free radicals scavenging process and phenolic content in commercially available samples of beer

przy zastosowaniu metody kinetycznej a wartością związków fenolowych obecnych w tych próbkach.

Jak wynika z danych zamieszczonych na rysunku 5, istnieje słaba korelacja pomiędzy wynikami przeprowadzonych oznaczeń. Oznacza to, że prawdopodobnie obydwie stosowane metody pomiarowe wykazują różnice w czułości w stosunku do tych składników piwa.

Wniosek

Zarówno zawartość związków polifenolowych, jak i zawartość flawonoidów oraz właściwości przeciwrodnikowe badanych roztworów sporządzonych z różnych handlowych piw, w głównej mierze zależą od ich pochodzenia.

Piśmiennictwo / References

1. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa 2008.
2. Wybieralska K. Towaroznawcza ocena wpływu składników mineralnych zawartych w produktach rynkowych na wybrane właściwości flawonoidów. UE, Poznań 2008.
3. Gliszczyńska-Świgło A. Przeciwutleniające i proutleniające właściwości wybranych składników żywności jako wyróżnik jej jakości. UE, Poznań 2010.
4. Tarasiewicz K. Kawa i herbata na ziemiach polskich. Handel, konsumpcja, obyczaje. SGH, Warszawa 2009.
5. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965, 16: 144-158.
6. Kantecki T, Szymusiak H, Zieliński R. Antiradical activity of several home made fruit wines. Pol J Commodity Sci 2009, 3(20): 72-80.
7. Karadeniz F, et al. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. Turk J Agric For 2005, 29(4): 297-303.
8. http://www.varia.webd.pl/modules.php?name=News&file =article&sid=26